

PROTEOME ANALYTICAL METHOD

Publication number: JP2002333430

Publication date: 2002-11-22

Inventor: YOSHIZATO KATSUTOSHI; DAN BATSUKU
KURISUTENSEN

Applicant: JAPAN SCIENCE & TECH CORP; HIROSHIMA IND
PROMOTION ORGANI

Classification:


- international: **G01N27/447; G01N33/58; G01N33/68; G01N27/447;
G01N33/58; G01N33/68; (IPC1-7): G01N27/62;
C12Q1/02; C12Q1/37; G01N27/447; G01N33/483**

- european: G01N27/447; G01N27/447C4; G01N33/58;
G01N33/68A; G01N33/68A4

Application number: JP20010139034 20010509

Priority number(s): JP20010139034 20010509

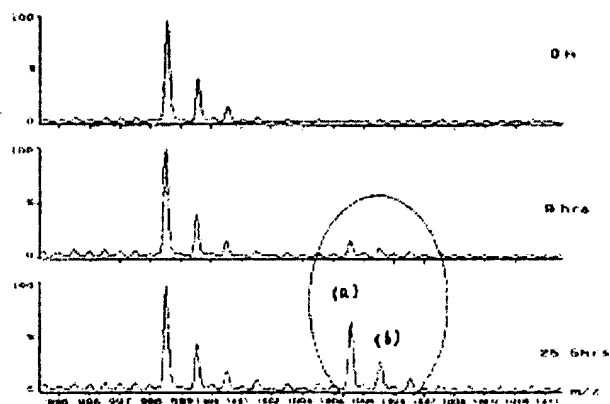
Also published as:

 WO02090970 (A1)

Report a data error here

Abstract of JP2002333430

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new proteome analytical method for analyzing quantitatively the state of genome manifestation by tracing with the passage of time the quantitative change of a protein wherein cells are manifested. **SOLUTION:** A culture solution including an isotope-labeled amino acid is added to living cells, and the living cells are cultured, and the living cells are gathered after elapse of a fixed time, and the protein is extracted. Thereafter, the extracted protein is developed by two-dimensional electrophoresis and split, and the protein having the labeled amino acid and the protein having no labeled amino acid are quantitated respectively from the mass difference relative to the split optional protein.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-333430

(P2002-333430A)

(43)公開日 平成14年11月22日(2002.11.22)

(51)IntCl.⁷
G 0 1 N 27/62

識別記号

F I
G 0 1 N 27/62

テマコード(参考)

V 2 G 0 4 5
C 4 B 0 6 3
XC 1 2 Q 1/02
1/37C 1 2 Q 1/02
1/37

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-139034(P2001-139034)

(22)出願日 平成13年5月9日(2001.5.9)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71)出願人 596063056

財団法人 ひろしま産業振興機構

広島県広島市中区千田町3丁目7-47

(72)発明者 吉里 勝利

広島県東広島市八本松南7-22-13

(72)発明者 ダン バック クリステンセン

デンマーク国 オーデンセ シー 5000.

ヴィンタバーストラデ33, 1番

(74)代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロテオーム解析方法

(57)【要約】

【課題】 細胞が発現している蛋白質の量的変化を経時的に追跡し、ゲノム発現の状態を定量的に解析するための新規なプロテオーム解析方法を提供する。

【解決手段】 生細胞に同位体標識アミノ酸を含む培養液を添加し、該生細胞を培養して一定時間経過後に該生細胞を採取し、蛋白質を抽出した後、抽出された蛋白質を二次元電気泳動で展開して分取し、分取された任意の蛋白質について、標識アミノ酸を有する蛋白質と有さない蛋白質をその質量差からそれぞれ定量する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生細胞に同位体標識アミノ酸を含む培養液を添加し、該生細胞を培養して一定時間経過後に該生細胞を採取し、蛋白質を抽出した後、抽出された蛋白質を二次元電気泳動で展開して分取し、分取された任意の蛋白質について標識アミノ酸を有する蛋白質と有さない蛋白質をその質量差からそれぞれ定量することを特徴とするプロテオーム解析方法。

【請求項2】 請求項1のプロテオーム解析方法において、二次元電気泳動で展開して分取された任意の蛋白質は、さらに蛋白質分解酵素により分解し、オリゴペプチドとした後、質量差によりオリゴペプチドを分離して、分離されたオリゴペプチドについて、標識アミノ酸を有するオリゴペプチドと有さないオリゴペプチドを定量するプロテオーム解析方法。

【請求項3】 請求項2のプロテオーム解析方法において質量差により分離されたオリゴペプチドは、標識アミノ酸を有するオリゴペプチドを中性ガスと衝突させ、さらに断片化し、その断片化イオンの質量差からアミノ酸配列を解析するプロテオーム解析方法。

【請求項4】 同位体標識アミノ酸が同位体標識ロイシンである請求項1ないし3のいずれかのプロテオーム解析方法。

【請求項5】 同位体が安定同位体である請求項1ないし4のプロテオーム解析方法。

【請求項6】 安定同位体が重水素である請求項5のプロテオーム解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、プロテオーム解析方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、ゲノムによってコードされる蛋白質を総合的に解析するプロテオーム解析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】近年、ゲノムの解析によって膨大な遺伝子情報が明らかにされつつある。今後は、遺伝子の機能を解析、解明していくことがこの分野の新たな課題となり、遺伝子情報と細胞内で複雑に相互作用している多様な蛋白質との関係を明らかにする「プロテオーム解析」という概念が提唱されている(Karn, P. Science 270, 369-70, 1995)。すなわち、プロテオーム解析は、細胞の機能を支える多様な蛋白質の関係を総合的に捕らえようとする試みである。

【0003】従来、細胞が発現する蛋白質のプロテオーム解析には、二次元電気泳動が用いられている。二次元電気泳動では、発現した蛋白質をゲルに展開し、対象とする蛋白質に対応したスポットの切り出しによりその種類を総合的に同定することができることから、プロテオーム解析における有用な定性手段であるといえる。しか

し、展開される蛋白質が微量であり、分析時の回収率に誤差が入り易いため、二次元電気泳動では蛋白質の定量といった量的な解析は極めて困難である。

【0004】そこで、対象とする細胞間での蛋白質発現を量的に比較する方法として、比較する2種類の細胞を、それぞれ同位体標識アミノ酸を含む培地と同位体標識アミノ酸を含まない培地で同じ条件下で培養し、培養された細胞を混合した後、蛋白質を抽出して、同位体標識アミノ酸を有する蛋白質と有さない蛋白質の質量比を比較する方法（「同位体ラベル法によるプロテオーム変動解析」）が提案されている（小田 吉哉「プロテオーム解析法」羊土社 2000年7月10日発行pp.111-122;Y. Oda, K. Huang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 96, pp. 6591-6596, June 1999）。この方法では、生物的に培養条件および分析条件が同じであるため、分析における回収率の誤差があったとしても、細胞間の相違を定量的に知ることができる。しかし、この方法では、比較する一方の細胞を標識アミノ酸含有培地、他方を標識アミノ酸非含有培地で培養することから、比較する細胞間の定常状態における相対的な蛋白質発現特性の差が得られるものの、単独細胞による蛋白質合成の経時的な変化を知ることはできないという問題があった。

【0005】そこで、高分子化合物の合成における経時変化を観察する方法として知られている、安定同位元素を用いた標識法を蛋白質の生合成に適用する試みがなされている（C. Papageorgopoulos, K. Caldwell, et al., Analytical Biochemistry, 267, pp. 1-16 (1999)）。Papageorgopoulosらは、重水素標識されたロイシンをネズミに注射して、血清よりアルブミンを分取し、該蛋白質を消化することにより血清アルブミンの合成挙動を調べている。さらに、アルブミンの特定ペプチドを高速液体クロマトグラフィ（HPLC）で分取し、次いで質量分析を用いて標識アミノ酸含有ペプチドと標識アミノ酸非含有ペプチドの量比パターンを解析することによって生体内の合成速度を調べている。この方法は、細胞中の標識アミノ酸濃度を計算で求めることができるため、生体内の蛋白質合成に適用するには有用な方法といえる。しかし、生体内では標識アミノ酸の添加後も標識アミノ酸を含まないペプチドが合成される場合があり、この方法では、このような場合に複雑な確率計算が必要となるという問題があった。従ってPapageorgopoulosらの方法は、プロテオーム解析で多くの蛋白質を総合的に解析するには汎用性に乏しいものであった。また、この方法では、十分な精度を得るためには大量のペプチドが必要であるため、従来プロテオーム解析で一般的に用いられてきた二次元電気泳動が適用できないという問題もあった。

【0006】この出願の発明は、以上のとおりの事情を鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解決し、細胞が発現している蛋白質の量的変化を経時的に追

跡し、ゲノム発現の状態を定量的に解析できる新規なプロテオーム解析方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、まず第1には、生細胞に同位体標識アミノ酸を含む培養液を添加し、該生細胞を培養して一定時間経過後に該生細胞を採取し、蛋白質を抽出した後、抽出された蛋白質を二次元電気泳動で展開して分取し、分取された任意の蛋白質について、標識アミノ酸を有する蛋白質と有さない蛋白質をその質量差からそれぞれ定量することを特徴とするプロテオーム解析方法を提供する。

【0008】第2には、この出願の発明は、前記第1の発明において二次電気泳動で展開して分取された任意の蛋白質を、さらに蛋白質分解酵素により分解し、オリゴペプチドとした後、質量差によりオリゴペプチドを分離して、分離されたオリゴペプチドについて、標識アミノ酸を有するオリゴペプチドと有さないオリゴペプチドを定量するプロテオーム解析方法を提供する。

【0009】また、この出願の発明は、第3には、前期第2の発明において質量差により分離されたオリゴペプチドを、標識アミノ酸を有するオリゴペプチドを中性ガスと衝突させてさらに断片化し、その断片化イオンの質量差からアミノ酸配列を解析するプロテオーム解析方法を提供する。

【0010】第4には、この出願の発明は、標識アミノ酸がロイシンである前記のいずれかのプロテオーム解析方法を提供する。

【0011】さらに、この出願の発明は、第5には、同位体が安定同位体である前記のいずれかのプロテオーム解析方法を、そして、第6には、安定同位体が重水素である前記のプロテオーム解析方法をも提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】この出願の発明のプロテオーム解析方法では、まず、人工的に標識されたアミノ酸を含まない環境で育成及び／又は培養された無標識生細胞に、同位体標識アミノ酸を含む培養液を添加する。これにより、同位体標識アミノ酸の添加以降に生合成される蛋白質は、同位体標識アミノ酸を取り込み、同位体標識アミノ酸を有する蛋白質（以下、「標識蛋白質」と呼ぶ）となる。したがって、同位体標識アミノ酸の添加以前に合成された同位体標識アミノ酸を有さない蛋白質（以下、「非標識蛋白質」と呼ぶ）とは質量差によって分離することができるようになる。そして、標識蛋白質と非標識蛋白質との量比から、該蛋白質の細胞内における生合成に関する経時変化を求めることができるのである。

【0013】この出願の発明のプロテオーム解析方法においては、前記のとおり細胞内で生合成される蛋白質を、同位体標識アミノ酸の添加前後で比較することにより、定量できるものである。同位体標識アミノ酸には、

放射性同位体を適用することもできるが、放射性を有さない安定同位体は、取り扱いが容易であることから、特に好ましい。安定同位体標識された蛋白質の検出精度を上げるためには、このような安定同位体として、蛋白質に多く含まれる元素を用いることが重要である。すなわち、水素、炭素、窒素のいずれかが好ましく適用される。これらの安定同位体としては、それぞれ、 ^2H 、 ^{13}C 、および ^{15}N が知られている。これらはいずれも前記のとおり放射性を有さず、取り扱いが容易であるが、 ^{13}C は質量分析においてピークが複雑に重なるため解析が難しくなる恐れがあり、 ^{15}N は細胞を死滅させる場合があることから、 ^2H を用いることが最も好ましい。

【0014】したがって、この出願の発明のプロテオーム解析方法においては、標識アミノ酸の添加前から存在していた蛋白質と標識アミノ酸添加後に生合成された蛋白質を、安定同位体と通常元素との質量差から定量できることになる。しかし、このような質量差による分析は、蛋白質全体では複雑となる場合がある。このような場合には、対象とする蛋白質をオリゴペプチドに分解した後、標識アミノ酸を有するオリゴペプチド（以下、「標識ペプチド」と呼ぶ）と標識アミノ酸を有さないオリゴペプチド（以下、「非標識ペプチド」と呼ぶ）を質量分離して定量することにより、より簡便にプロテオーム解析を行うことができる。また、質量分離できるオリゴペプチドの種類を増やすためにも、標識する同位体は、前期のとおり蛋白質中に多く含まれる元素の同位体とすることが好ましい。具体的には、前記の安定同位体、中でも ^2H が好ましい。

【0015】細胞培養液中の同位体標識アミノ酸は、一種類のアミノ酸であっても、複数種または全てのアミノ酸であってもよい。中でも一種類のアミノ酸を使用する方法が、測定結果の解析が容易であり、好ましい。同位体標識するアミノ酸は、各種のものから選択されるが、中でもロイシンは蛋白質に平均9%と多く含まれているアミノ酸であり、蛋白質を分解してオリゴペプチドとした場合でもいずれかのオリゴペプチドには必ず1~2個の標識ロイシンが存在することが期待できることから、同位体標識アミノ酸として好ましい。また、ロイシンは生体内では合成できない必須アミノ酸であるため、細胞内で生合成される分子の標識として適切といえる。さらに、自然界には ^2H の導入されたロイシンは存在しないため、 ^2H 標識ペプチドは、非標識ペプチドと質量差3以上で分離でき、汎用の機器でも質量分析が容易に行えるようになり、好ましい。

【0016】 ^2H で標識されたロイシンとしては、種々のものが考慮されるが、中でもロイシン-5,5,5- D_3 （L-leucine-5,5,5- $^2\text{H}_3$ ：以下「 D_3 ロイシン」とする）は、市販されており、安定同位体元素標識アミノ酸の中では比較的安価（85千円/g）であり、好ましい。

【0017】この出願の発明のプロテオーム解析方法で

は、まず、以上のとおりの同位体標識アミノ酸を含有する培養液を、生細胞に添加する。このとき、生細胞は、同位体標識されたアミノ酸を含まない培地で育成および／または培養されたものであればよく、その種類や培養条件はとくに限定されない。分析の対象とする蛋白質の生合成が行われる（または行われると考えられる）各種の生細胞、特に動物細胞から適宜選択できる。培養条件はどのようなものであってもよく、液体培地あるいは固体培地に該生細胞を培養するのに好適な条件、またはその効果を調べたい培養条件を選択すればよい。一方、同位体標識アミノ酸を含有する培養液は、同位体標識されたアミノ酸を少なくとも一種類含有していればよく、その組成等はとくに限定されない。具体的には、標識アミノ酸とともに、塩類、炭素源、窒素源、グルコースやビタミン、アミノ酸等の有機物等の中から前記生細胞の生存や増殖を維持するために必要なものを一種ないし複数種類組み合わせる含有するもの、さらには、生細胞に適した浸透圧とpHを維持するための緩衝液系を含有するものが考慮される。もちろん、種々の市販の液体培地に標識アミノ酸を混合して用いてもよい。

【0018】この出願の発明のプロテオーム解析方法では、生細胞に標識アミノ酸を含む以上のとおりの培養液を添加した後、一定時間経過後の細胞を採取して、細胞培養中の蛋白質発現を解析するものであるが、具体的には様々な解析方法が考慮される。例えば、前記のとおり標識アミノ酸含有培養液添加後の経時変化を解析する場合には、初期値として、培養液添加直前の細胞も採取し、同様の解析を行ったり、細胞採取後の培地に残った細胞を継続的に培養して、同様の解析を行ったりすることにより、蛋白質発現の経時変化を追跡することもできる。この場合、例えば0、8、25時間後のように、経過時間ごとに約同数の細胞を採取して行えばよい。この出願の発明のプロテオーム解析方法では、厳密に同じ細胞数とする必要はない。

【0019】この出願の発明のプロテオーム解析方法では、生細胞に標識アミノ酸を含む以上のとおりの培養液を添加した後、一定時間経過後の細胞を採取し、採取した細胞から蛋白質を分取して、標識蛋白質と非標識蛋白質を比較する。採取した細胞から蛋白質を分取する方法はとくに限定されないが、破碎・遠心分離等の生物化学的実験において一般的に用いられる手法を適用できる。分取された蛋白質には、標識アミノ酸と、同種の非標識アミノ酸（すなわち天然アミノ酸）が混在している。そこで、二次元電気泳動による蛋白質の分離を行い、両者を定量することができる。

【0020】しかし、多くの場合、標識アミノ酸と天然アミノ酸とは、質量差が小さい（例えば天然ロイシンと前記D3ロイシンでは、0.24%）ため、標識蛋白質と非標識蛋白質間の質量差から二次元電気泳動のスポット上で両者を分離することは困難である。

【0021】そこで、次に、二次元電気泳動により分離された対象蛋白質をゲルから切り出し、蛋白質分解酵素により消化してオリゴペプチドとした後、質量分析を行うことが好ましい。標識アミノ酸含有培養液が添加された後に生合成された蛋白質に由来する質量分析スペクトルには、いくつかのオリゴペプチドで質量差によるペプチドピークの分離が明確に見られる。そこで、そのようなピーク分離を示すオリゴペプチドの二つのピークから、標識ペプチド（大質量）と天然ペプチド（小質量）の量を比較すれば、生細胞における該蛋白質の生合成を解析することができる。また、両者の相対的な量は、ピーク高さの比から定量することができる。

【0022】この出願の発明のプロテオーム解析方法では、上記のとおり蛋白質を消化して得られたオリゴペプチドの質量分析は、ガスクロマトグラフと結合された質量分析装置（GC/MS）や液体クロマトグラフと結合された質量分析装置（LC/MS）等の汎用の装置を用いて行うことができる。質量分析におけるイオン化方法は、各装置に応じて適宜選択できる。例えば、EI法、CI法、APCI法、LD（またはLI）法、FD法、SIMS法、FAB法、TSP法、ESI法等の様々な方法が挙げられる。質量分析では、各種イオン化法により生成したペプチド断片イオンは、アナライザーにおいてその質量に応じて分離される。アナライザーとしては、単収束磁場型（セクター型）、四重極型（QMS）、二重収束型（高分解能型）、飛行時間型（TOF）、イオンサイクロトロン型（FTMS）やこれらを組み合わせたアナライザーが例示される。これらの中から使用する質量分析装置に応じたものを選択すればよい。

【0023】この出願の発明は、生合成蛋白質間の相対的な経時変化の測定および解析を可能とするものであるが、蛋白質の定量方法としては、具体的にいくつかの方法が考えられる。最も単純には、培養条件を等しくし、一定時間経過後の非標識蛋白質と標識蛋白質の量を比較する方法がある。非標識蛋白質の量は、標識アミノ酸含有培養液の添加前に合成された蛋白質の量を、標識蛋白質の量は、標識アミノ酸含有培養液を添加してから細胞採取時まで合成された蛋白質の量を示している。これによって各蛋白質間の発現速度の比が定量的に求められる。

【0024】次に、蛋白質の発現速度の解析方法を例示する。

【0025】継代培養を行わない容器中の細胞は十分時間をおくことにより、一定量の蛋白質を合成して定常値になると考えられる。したがって、その時間関数は任意スケールで、

$$1 - e^{-kt}$$

（ただし、kは速度の定数、tは細胞の採取時刻を示す）と表すことができる。標識アミノ酸含有培養液の添

加時 (t_0) の特定蛋白質質量 (m_0) は、

$$1 - e^{-kt_0} = m_0$$

となり、2つの採取時刻 (t_1 、 t_2) における標識蛋白質の質量 (測定値: m_1 、 m_2) は、

$$1 - e^{-kt_1} = m_0 + m_1$$

$$1 - e^{-kt_2} = m_0 + m_2$$

となる。

【0026】したがって、速度定数 k が求められる。このとき、 m_0 は未知であるが、 m_1/m_0 および m_2/m_0 は測定値から得られるので、

$$m_1/m_2 = (1 - e^{-k(t_1-t_0)}) / (1 - e^{-k(t_2-t_0)})$$

と表される。

【0027】以上説明したとおりに、この出願の発明のプロテオーム解析方法では、標識アミノ酸含有培養液添加前後に生成される蛋白質を定量することができる。この出願の発明のプロテオーム解析方法では、さらに、質量分析計によりイオン化したオリゴペプチドの中から標識ペプチドを分取し、中性ガスに衝突させて断片化することにより、そのペプチド断片イオンの質量差からアミノ酸配列を決定することもできる。

【0028】前記のとおり各種の方法から選択される方法によってイオン化されたオリゴペプチドを適当なアナライザーによって分離し、標識ペプチドを分取した後、中性ガスに衝突させて断片化する際には、中性ガスとしてアルゴンが好適に用いられる。また、質量分離は、前記の各種アナライザーを用いて行うことができる。このようにしてオリゴペプチドを断片化することにより、天然体では分離できなかったロイシン (116Da) とイソロイシン (113Da) をも質量分離できるようになる。さらに、オリゴペプチドのアミノ酸シーケンスが即座に同定できるため、蛋白質を迅速に同定できるようになる。

【0029】以上のとおり、この出願の発明のプロテオーム解析方法では、生細胞における蛋白質合成の時間的変化を総合的に分析することができる。これによって蛋白質に関して、例えば以下のような総合的な定量解析が可能となる。

【0030】(1) 細胞の成長状態: 各種の細胞を同じ条件で培養し、この出願の発明の方法により解析することにより、蛋白質合成速度の速い細胞 (すなわち成長中の細胞) と遅い細胞 (定常細胞) とを迅速に判別できる。

【0031】(2) 蛋白質発現における細胞培養条件の影響: 特定遺伝子によってコードされる蛋白質を優位に発現する条件、発現させない条件を調べることができる。例えば標識培地に試験物質 (化合物や蛋白質等) を含有させ、この出願の発明の方法を用いて蛋白質発現の抑制や促進が見られるかを経時的に解析することにより、該試験物質の毒性や有効性に関する具体的な知見を得ることができる。また、発現速度の相関関係から、蛋

白質間の相互関係を推定することも可能となる。

【0032】(3) 細胞特性の比較: 異なる生細胞 (例えば正常細胞と病変細胞) を同じ条件で培養し、蛋白質の発現速度を比較すれば、各々の細胞特性を比較することができる。また、異なる生細胞の継代培養を、標識培地を用いて続けられれば、非標識蛋白質は希釈されて極微量となり、標識蛋白質のみが得られるようになる。

【0033】以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【0034】

【実施例】<参考例1>

(a) 培養液の調製

基本培地は、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。

【0035】標識アミノ酸はロイシン [L -Leucine-5, 5, 5 - 2H_3] (Leu_{d3}) とした。

【0036】非標識基本培地には、市販のDMEM粉末 (カタログNo. 31600-034; ライフテックオリエンタル株式会社) を用い、標識基本培地用には、ロイシンを全く含まない同一組成の培地に99%以上が重水素置換された Leu_{d3} (カタログNo. 48,682-5; シグマアルドリッチジャパン株式会社) を非標識基本培地と同一のロイシン量 (105mg/L) となるように添加して調製した。

【0037】標識基本培地、非標識基本培地ともに、蒸留水1リットル中にDMEM粉末10gと、さらに0.84gの $NaHCO_3$ 、4.766gの2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) を添加して、pH7.5に調整した後、滅菌し、基本培地とした。

【0038】上記の非標識基本培地にウシ胎児血清10%、抗生物質 (ペニシリンG 100単位/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL) を添加したものを非標識培養液とし、標識基本培地に透析ウシ胎児血清10% (10% dialyzed amino acid-free fetal bovine serum)、抗生物質 (ペニシリンG 100単位/mL、ストレプトマイシン 100 μ g/mL) を添加したものを標識培養液とした。

(b) 細胞培養と試料の採取

生後4週齢のラット背部皮膚を剃毛消毒後、2cm角に切り取った。

【0039】皮膚片をさらに3mm角以下に細切後、3mLの上記非標識培養液を加えた直径10cmの培養皿に、表皮側を上にして均一に静置した。

【0040】37℃、5% CO_2 、95% airで24時間培養後、7mLの非標識培養液を追加し、必要に応じて培養液交換を行いながら、さらに14日間培養した。皮膚片の周囲に遊走してきた線維芽細胞をトリプシン処

理によって集め、非標識培養液の培養皿に蒔いて初代細胞培地とした。

【0041】初代細胞培地の初代細胞が約8割コンフルエントに達したとき、培養液を除去し、細胞全体をCMF-Hanks' (pH 7.5; GIBCO社製) で洗浄したのち、前記の標識培養液に交換した。この標識培養液の交換開始時刻を0時間とし、0時間、8時間、25.5時間経過後の培養細胞を採取した。25.5時間以降は、培地の細胞がコンフルエントに達するごとに標準培養液で継代を繰り返した。

【0042】各時間に採取した細胞は、破碎して遠心分離し、蛋白質を採取した。

(c) 二次元電気泳動

【ゲルの調整】次に100 μ g/500 μ L Lysis Bufferに調製した試料500 μ Lを再水とトレイ中に添加し、Immobiline Dry Strip (アマシヤム ファルマシア バイオテック株式会社製) をゲル面が下になるように試料液の上に置き、1次元ゲルの膨潤と試料の吸収を同時に行った。また、試料の乾燥を防ぐために、Dry Stripカバー液を適量重層し、室温で一晩静置した。

【0043】再水と後のゲルストリップを、Multiphor I 水平型電気泳動装置 (アマシヤムファルマシア バイオテック株式会社) 上にセットしたImmobiline Dry Stripキットのアライナーの溝に沿って並べ、電極をセットした。ゲルの上をDry Stripカバー液で覆い、恒温循環槽の上で電気泳動後、サンプルを-80℃で凍結保存した。

【電気泳動】Hoefer DALTマルチプルゲルキャスター (アマシヤム ファルマシア バイオテック株式会社製) にゲル作成板を固定し、Iso-Dalt System (アマシヤム ファルマシア バイオテック株式会社製) を用いて9~18%アクリルアミドゲルを作成し、固化するまで水飽和ブタノールを重層して室温で放置した。

【0044】固化後、MilliQ水でゲルを洗浄し、電気泳動に用いた。一次元目の電気泳動を終えたImmobilineストリップを6M尿素、30%グリセロール、50mM Tris-HCl (pH 8.3)、1% SDS、0.25% DTTで15分間平衡化した後、6M尿素、30%グリセロール、50mM Tris-HCl (pH 8.3)、1% SDS、4.5% ヨウ素化アセトアミド、a tip プロモフェノールブルー (BPB) で15分間平衡化した。

【0045】得られたアクリルアミドゲルの上に等電点電気泳動ゲルを載せ、その上に低融点アガロースを重層し、固化させて80Vで一晩電気泳動を行った。

【0046】二次元電気泳動後のゲルを銀染色し、ゲル乾燥を行った。ゲルをゲルカッターで切り抜き、15mM フェリシアン化カリウムおよび50mM チオ硫酸ナトリウムにより脱色し、MilliQ水で数回洗浄した。

【ペプチド分取と質量分析】次に脱色されたスポットゲルを100mM NH_4HCO_3 中で10分間振とうし、

100%アセトニトリル中で10分間振とうした。これを2回繰り返した後、30分間減圧乾燥し、IG緩衝液 (50mM NH_4HCO_3 、5mM CaCl_2 、0.02 μ L/ μ Lトリプシン、50% H_2^{18}O) でゲルを膨潤させ、37℃で一晩静置した。さらに、5% TFAを加え、反応を停止させた。50%アセトニトリル、5% TFAを加え、20分間ボルテックスにかけ、溶液中にペプチドを溶出させて上清を別の容器に回収した。この操作を3回繰り返した後、回収した上清を2時間減圧乾燥した。

【0047】得られたペプチドを四重極飛行時間型質量分析装置 (Q-TOF; Micromass社製) を用いて質量分析した。まず、GELoader Tipを支持体とし、POROS 50 R2逆相カラム担体 (Per Septive Biosystems (USA)社製) とOligo R3逆相カラム担体 (Per Septive Biosystems (USA)社製) の1:1混合物充填カラムを作成した。10 μ Lの20%メタノールおよび1%蟻酸で試料ペプチドを溶解し、カラム中で40 μ Lの1%蟻酸と混合させ、ペプチドを担体に吸着させた。1%蟻酸で洗浄した後、70%メタノール、1%蟻酸を用いて質量分析用のキャピラリー管に溶出した。キャピラリー管を上記のQ-TOFにセットし、試料に窒素ガスで圧力をかけてナノスプレーし、質量分析を行った。確認できたペプチドは、MS/MS測定に進めた。

【0048】この方法では、アルゴンガスをペプチドに当て、ペプチド結合等にランダムに解裂を生じさせ、マスビークの差からアミノ酸を決定した。したがって、アルゴンガス量は、ペプチドに応じて変化させた。

【0049】得られたオリゴペプチドの中から、2個のD3ロイシンを有し、天然ペプチドとの間に6Daの質量差を有するペプチドに関するスペクトルを図1に示した。

【0050】図より、D3ロイシン含有培養液を添加してから8時間後にはこのオリゴペプチドが微量生成されていることが確認され、25.5時間後には、標識ペプチド (同位体組成の異なるaおよびb) のピークはより明確となった。したがって、これらのピーク比から、天然ペプチドと標識ペプチドの相対的な量が求められることが確認された。

<実施例1> 参考例1の方法で得たラット皮膚線維芽細胞を用いて、本発明の蛋白質経時変化法によるプロテオーム解析試験を行った。

(a) 培養液の調製

参考例1と同様に標識培養液および非標識培養液を調製した。

(b) 細胞培養と試料の採取

細胞は、参考例1と同様の方法で培養した。

(c) 蛋白質の抽出と質量分析

参考例1と同様の方法で二次元電気泳動を行い、分離された各蛋白質に対応するスポットを切出した。

【0051】ここでは、予備試験によりスポット位置が明らかにされている α 、 β 、 γ アクチン、ER60等について調査した。

【0052】切出した各スポットをトリブシンにより消化し、溶媒（50 nM炭酸水素アンモニウム、5 mM塩化カルシウム、0.02 μ g/ μ l）でペプチドを細分化した。各蛋白質について細分化したペプチドをイオン化スプレーと四重極飛行時間型質量分析計（ジャスコインターナショナル株式会社；Q-ToF z型 四重極飛行

時間型質量分析装置）で質量分析した。

【0053】標識蛋白質および非標識蛋白質がピーク分離して得られた多数のペプチドの中から、分離が明瞭な対象ペプチドを定量した。各採取時間における標識ペプチドのピーク高さの非標識ペプチドのピーク高さに対する割合を各標識蛋白質の量として表1に示した。

【0054】

【表1】

蛋白質	対象分子(非標識)Da	採取時間		
		0h	8h	25.5h
α アクチン	998.5	0	22.4 \pm 0.4	45.0 \pm 1.0
β アクチン	1108.1	0	18.9 \pm 1.8	43.0 \pm 0.8
γ アクチン	1116.2	0	38.8 \pm 1.8	51.7 \pm 0.1
ER60	687.4	0	29.8 \pm 3.4	46.7 \pm 0.5
チューブリン α 1	786.0	0	32.1 \pm 1.2	50.8 \pm 0.9
カルギザリン	933.5	0	32.6 \pm 1.1	48.4 \pm 1.1
ガレクチン1	993.5	0	21.8 \pm 1.5	44.2 \pm 0.7
カルギザリン	933.5	0	32.6 \pm 1.1	48.4 \pm 1.1
ガレクチン1	993.5	0	21.8 \pm 1.5	44.2 \pm 0.7

【0055】表より、約1日で約50%の標識蛋白質が合成されていることが明らかになり、この細胞は、活発に分裂する状態にあることが確認された。この結果は、既知の細胞の倍化時間（約30時間）からみて妥当な値といえる。

＜参考例2＞参考例1および実施例1で培養されたラット線維芽細胞を、培地の細胞がコンフルエントに達するごとに標識培養液で繰り返し継代し、9日間培養した。

【0056】ラットの皮膚毛乳頭細胞（rat dermal papilla cells）を参考例1と同様の方法で調製した非標識培養液中で9日間継代培養し、等量の9日継代培養されたラット線維芽細胞と混合して消化分子の質量分析を行った。（ただし、実施例1のラット線維芽細胞を9日間培養して採取された蛋白質は、実施例1と同様の方法で分析し、標識ペプチドのみが存在すること、すなわち非標識ペプチドが検出されないことを確認した後、混合し

た。）

このように、この出願の発明のプロテオーム解析方法を長時間培養する細胞に適用した後、従来の「同位体ラベル法によるプロテオーム変動解析」を行えば、蛋白質量の比較が可能となる。

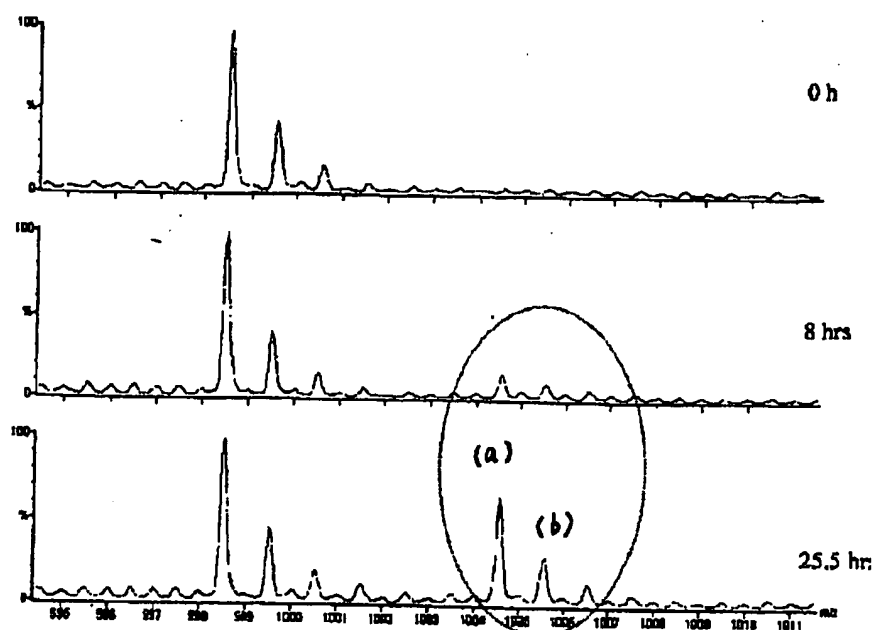
【0057】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって、生細胞における蛋白質の生合成を経時的、かつ総合的に定量できる新たなプロテオーム解析方法が提供される。この発明の方法は、蛋白質の分析や同定を、容易に、精度高く、かつ迅速に行うことを可能とし、有効なプロテオーム解析手段である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による重水素標識ロイシンおよび非標識ロイシンによる質量スペクトルの分離を例示する図である。（aおよびbは同位体組成の異なる標識ペプチド）

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

G 0 1 N 27/447
33/483

識別記号

F I

G 0 1 N 33/483

テーマコード (参考)

E

F

27/26

3 1 5 C

3 1 5 G

3 1 5 H

F ターム (参考) 2G045 AA34 DA36 FA34 FB05 FB08
4B063 QA01 QA18 QA20 QQ08 QQ79
QR16 QR49 QS14 QS16 QS24
QX10